

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 715 936

(21) N° d'enregistrement national :
94 01529

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 7/00, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68, C 12 P 21/02,
A 61 K 38/16

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 04.02.94.

(71) Demandeur(s) : Société Anonyme dite: BIO
MERIEUX — FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 11.08.95 Bulletin 95/32.

(72) Inventeur(s) : Perron Hervé, Mallet François,
Mandrand Bernard, Bedin Frédéric et Beseme
Frédéric.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(74) Mandataire : Cabinet Germain & Maureau.

(54) Virus MSRV1 associé à la sclérose en plaques, et ses constituants nucléiques.

(57) L'invention concerne un virus humain, possédant une
activité transcriptase inverse, associé à une famille d'élé-
ments rétroviraux endogènes et associé à la sclérose en
plaques, issu d'une souche virale possédant une activité
transcriptase inverse, choisie parmi les souches virales dé-
nommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992
auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et
MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le
numéro d'accès V93010818, et les souches variantes
consistant en des virus comprenant au moins un antigène
qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au
moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des vi-
rus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées.

L'invention concerne, en outre, les constituants nucléi-
ques dudit virus et leurs utilisations.

FR 2 715 936 - A1



La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la cause reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus connus testés ne s'est avéré être l'agent causal recherché : une revue des virus recherchés depuis des années dans la SEP a été faite par E. Norrby (Prog. Med. Virol., 1978 ; 24, 1-39) et R.T. Johnson (dans "Handbook of clinical neurology, 47 Demyelinating diseases". Vinken P. et Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier science Publishing, 1985, 319-336). Parallèlement, la possibilité d'un facteur exogène et/ou infectieux est suggérée par l'existence d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP comme ce qui a été observé dans les Iles Feroes entre 1943 et 1960 (Cook 1980), en Sardaigne (Rosati, 1988), en Norvège (Risse, 1991), ainsi que par les études sur les migrants (Elian, 1990). Parmi tous les facteurs exogènes suggérés, les virus ont été étudiés le plus souvent et une étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP, de phénomènes assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle" (voir : Lisak R.P., Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977 ; 297, 850-853, et, Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch. Neurol. 1979 ; 36, 490-497). Cependant, cette auto-immunité dirigée contre certains composants du système nerveux central (SNC) s'est révélée peu spécifique de la SEP et fréquente dans les inflammations du SNC, associées ou non à une infection, ainsi que cela a été montré par Hirayama M. et coll. (Neurology 1986 ; 36, 276-8), Kenneth G. Warren et coll. (Annals of Neurology 1986 ; 20, 20-25), Suzumura A. et coll. (Journal of Neuroimmunology 1986 ; 11, 137-47), et, Tourtelotte W. et coll. (Journal of Neurochemistry 1986 ; 46, 1086-93). De plus, comme l'a fait remarquer E.J. Field (The Lancet 1989 ; I, 1272.)

aucune des thérapeutiques immuno-suppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP. Il semble maintenant probable que les manifestations "auto-immunes" sont induites par un mécanisme d'origine virale : 5 co-sensibilisation à des déterminants vitaux associés à des molécules d'origine cellulaire, phénomènes de mimétisme moléculaire -comme cela a été décrit par Fujinami R.S et Oldstone M.B.A (dans "Molecular mimicry : Cross-reactivity between microbes and host proteins as a 10 cause of autoimmunity". Oldstone M.B.A., ed.. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin, Springer-Verlag, 1989)- ou, selon P. Rudge (Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1991 54, 853-855), 15 par expression de superantigènes rétroviraux.

15 Des travaux ont étayé une hypothèse selon laquelle un rétrovirus serait à l'origine de la maladie : la découverte récente par A. Gessain et coll. (J. Infect. Disease 1988 ; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de 20 leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs, tels que H. Koprowski et coll. (Nature 1985 ; 318, 154), M.Ohta et coll. (J. Immunol. 1986 ; 137, 3440), E. P. Reddy et coll. (Science 1989 ; 243, 529), S.J. Greenberg et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 ; 86, 2878), J.H. 25 Richardson et coll. (Science 1989 ; 246, 821), S.L. Hauser et coll. (Nature 1986 ; 322, 176) et A. Karpas et coll. (Nature 1986 ; 322, 177), à rechercher une implication de ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.

30 Par ailleurs, il existe un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus MAEDI-VISNA du mouton . Il est connu que l'infection naturelle par ce virus peut provoquer deux types de maladies chez cet animal : le Maedi, une pneumonie 35 interstitielle lymphocytaire qui peut survenir lors de la primo-infection par ce rétrovirus et une pathologie

neurologique démyélinisante tardive suivant généralement une phase de latence prolongée, le Visna. La physiopathologie du Visna naturel concorde avec la plupart des données cliniques et biologiques de la SEP, comme le rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 89-98), et Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82). L'infection expérimentale des moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la genèse de cette affection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. (dans, "Handbook of clinical neurology, 12 : Viral diseases" R.R. Mc Kendall, ed.. Elsevier science Publishing, Amsterdam, 1989, p. 453-466), et A. Haase (Nature 1986 ; 322, 130-136), elle diffère de l'infection naturelle par ses conséquences neuropathologiques exacerbées, mais reste proche de la SEP. Il est de plus notable que, dans l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, notamment, le virus Visna est régulièrement retrouvé dans les cellules de plexus choroïdes du cerveau qui constituent un site de latence et de réPLICATION occasionnelle du provirus Visna; la localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalo-rachidien (LCR) explique certainement ce phénomène.

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus humains connus a été isolé chez des patients atteints de SEP par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561/ dans : "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p. 111-116/ The Lancet 1991 ; 337, 862-863). Les auteurs ont aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis *in vitro*, que des patients atteints de SEP produisaient des anticorps susceptibles de reconnaître des

protéines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoce de certains herpesvirus (Perron et 5 coll. Herpes simplex virus ICPO and ICP4 immediate-early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell-line from multiple sclerosis. 1993. J. Gen. Virol. 74 ; 65-72).

Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans 10 la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561) et qualifiée d'activité "RT de type LM7".

15 Récemment, les travaux de la demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans la demande de brevet n° 20 WO 93/20188. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées PLI-2 et LM7PC ont été déposées à l'ECACC respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et 93010817, conformément aux dispositions du traité de Budapest. Par 25 ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'ECACC sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée POL-2, a été déposée le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou 30 isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, et a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

A partir des cultures et des isolats précités, caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on a caractérisé le matériel nucléique 35 associé aux particules virales produites dans ces cultures, comme décrit ultérieurement.

Ces travaux ont notamment permis d'identifier un virus humain présentant une activité transcriptase inverse issu des souches virales précitées.

Ainsi, les objets de la présente invention sont 5 les suivants.

- un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes et associé à la sclérose en plaques, issu d'une souche virale possédant une activité 10 transcriptase inverse, choisie parmi les souches virales dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et les souches variantes consistant en 15 des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées.

- un virus humain possédant une activité 20 transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, associé à la sclérose en plaques, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées cellulaires dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 25 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et toutes les cultures cellulaires infectées susceptibles de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène 30 correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées.

- un virus dont le génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec la 35 séquence nucléotidique SEQ ID N01, décrite à la Figure 1, ou sa séquence complémentaire.

- un rétrovirus humain, associé à la sclérose en plaques dont le génome présente un gène pol comprenant une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % d'homologie avec une séquence nucléotidique appartenant au 5 gène pol du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV9.

- un rétrovirus humain associé à la sclérose en plaques dont le génome présente un gène pol qui code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie, avec une séquence 10 peptidique codée par le gène pol du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV9.

- un rétrovirus humain, associé à la sclérose en plaques dont le génome présente un gène pol qui code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de 15 préférence au moins 70 % d'homologie, avec une séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

- une lignée cellulaire déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817.

20 - une souche virale déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816

- un fragment nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie, avec la SEQ ID N01 25 ou sa séquence complémentaire.

- un fragment de l'invention consistant en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

30 - un ARN ou ADN et notamment vecteur de réplication, comprenant un fragment de l'invention.

- une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques comprenant une séquence 35 nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence

au moins 70 % d'homologie, avec au moins une partie d'un fragment de l'invention.

- une amorce préférentielle ayant au moins 10 nucléotides et, étant choisie parmi SEQ ID N02 et SEQ ID 5 N03, toutes deux décrites à l'Exemple 2 qui suivra.

- une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques comprenant une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence 10 au moins 70 % d'homologie, avec au moins une partie d'un fragment de l'invention.

- une sonde préférentielle ayant au moins 10 nucléotides.

- une utilisation d'une sonde de l'invention ou 15 d'une amorce de l'invention, pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un virus associé à la sclérose en plaques.

- une composition thérapeutique antisens, notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, 20 comprenant au moins une séquence nucléotidique selon l'invention.

- un procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un 25 ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leurs complémentaires, à au moins une séquence nucléotidique selon l'invention.

- un procédé préférentiel de l'invention est caractérisé en ce que, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN 30 ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce de l'invention et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

- un procédé pour quantifier, dans un échantillon 35 biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un

ADN spécifique audit virus et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires à au moins une sonde de l'invention.

5 - un peptide codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique de l'invention.

10 - une protéine comprenant un peptide de l'invention.

15 - un oligopeptide comprenant au moins cinq aminoacides contigus d'un peptide de l'invention.

20 - une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, comprenant au moins un peptide de l'invention, ou au moins une protéine de l'invention ou au moins un oligopeptide de l'invention.

25 15 - une composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou prophylactique, comprenant un ligand spécifique à au moins un peptide, une protéine, ou un oligopeptide, tels que définis précédemment.

30 Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

25 - selon l'invention, un fragment nucléotidique ou un oligonucléotide est un enchaînement de monomères, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par 30 recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

35 - ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la

guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases 5 modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation, au niveau du sucre à savoir le remplacement 10 d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), au niveau du groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

15 - par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels,

20 - par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparentent pour former un double brin,

25 - une sonde est un fragment nucléotidique comprenant au moins 10 monomères, avantageusement de 10 à 50 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées. Une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic telles que les sondes de capture et/ou de détection ou à des fins de thérapie,

30 - la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

35 - la sonde de détection est marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la peroxydase et la

phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorogène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorogènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (MANIATIS et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982), "SOUTHERN BLOT" (SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), "NORTHEN BLOT" qui est une technique identique à la technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23 (1977)] ; avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- une autre application de l'invention est une sonde de thérapie, ladite sonde étant susceptible de s'hybrider *in vivo* sur l'ARN et/ou sur l'ADN pour bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription,

- une amorce est une sonde comprenant de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'elongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- l'homologie caractérise le degré de similitude de deux fragments nucléotidiques comparés.

35 Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement

caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi bien de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse.

5 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures annexées, dans lesquelles :

10 - la figure 1, représente la séquence nucléotidique d'un clone dénommé PSJ17, identifiée sous la référence SEQ ID N01,

15 - la figure 2, est une comparaison de la séquence nucléotidique du clone PSJ17 avec celle d'un rétrovirus endogène connu, dénommé ERSV9 ou HERSV9,

20 - la figure 3, correspond à la traduction en acides aminés de la séquence du clone PSJ17, représenté à la figure 1, et

25 - la figure 4, illustre la comparaison entre la séquence protéique de PSJ17 et la séquence théorique de ERSV9, telle que décrite par LA MANTIA et col (Nucleic Acids Research, Vol. 19, N° 7, 1513-1520) (1991)).

EXEMPLE 1 : OBTENTION D'UN CLONE PSJ17, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1A, PAR REACTION DE TRANSCRIPTASE INVERSE ENDOGENE SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA LIGNEE PLI-2.

30 Cette approche vise à obtenir des séquences d'ADN rétrotranscrites à partir de l'ARN supposé rétroviral dans l'isolat en utilisant l'activité transcriptase inverse présente dans ce même isolat. Cette activité transcriptase inverse ne peut théoriquement fonctionner qu'en présence d'un ARN rétroviral, lié à un ARNt amorce ou hybridé à des brins courts d'ADN déjà rétro-transcrits dans les particules rétrovirales (Lori F. et coll. J. Virol. 1992 ; 66, 5067-5074). Ainsi l'obtention de séquences rétrovirales spécifiques dans un matériel contaminé par 35 des acides nucléiques cellulaires, était optimisée grâce à l'amplification enzymatique spécifique des portions d'ARN

viraux par une activité transcriptase inverse virale. Les auteurs ont, pour cela, déterminé les conditions physico-chimiques particulières dans lesquelles cette activité enzymatique de transcription inverse sur des ARN contenus 5 dans des virions pouvait être effective *in vitro*; ceux-ci correspondent à la description technique des protocoles présentés ci-dessous (réaction de RT endogène, purification, clonage et séquençage).

- Préparation de virion concentré à partir de 10 surnageants de culture de la lignée PLI-2 :

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une préparation de virion concentré, mais non purifié, obtenu à partir des surnageants de culture de la lignée PLI-2 préparé selon la méthode suivante : les surnageants de 15 cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 tpm pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un 20 coussin de PBS-glycérol 30 % à 100 000g (ou 30 000 tpm dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Cet 25 échantillon viral concentré mais non purifié a été utilisé pour effectuer une réaction dite de transcription inverse endogène, telle que décrite ci-après.

- Réaction de transcriptase inverse endogène :

Un volume de 200 μ l de virions purifiés selon le 30 protocole décrit ci-dessus et contenant une activité transcriptase inverse d'environ 1-5 million de DPM (désintégrations par minute) est décongelé à 37°C jusqu'à apparition d'une phase liquide, puis placé sur de la glace. Un tampon 5 fois concentré a été préparé avec les 35 composants suivants : Tris-HCl pH 8.2, 500 mM; NaCl 75 mM; MgCl₂ 25 mM; DTT 75 mM et NP 40 0.10 %. A 100 μ l de ce

tampon ont été ajoutés : 25 μ l d'une solution de dATP 100 mM, 25 μ l d'une solution de dTTP 100 mM, 25 μ l d'une solution de dGTP 100 mM, 25 μ l d'une solution de dCTP 100 mM, 100 μ l d'eau distillée stérile et 200 μ l de la 5 suspension de virions (activité transcriptase inverse de 5 millions de DPM) dans le PBS ont été mélangés et incubés à 42°C pendant 3 heures. Après cette incubation le mélange réactionnel est directement mélangé avec un mélange tamponné phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. 10 P 3803), la phase aqueuse est collectée et un volume d'eau distillée stérile est ajouté à la phase organique pour ré-extraire le matériel nucléique résiduel. Les phases aqueuses collectées sont regroupées et les acides nucléiques contenus sont précipités par addition d'acétate 15 de sodium 3M pH 5,2 au 1/10 de volume + 2 volumes d'éthanol + 1 μ l de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) et mise à -20°C de l'échantillon pendant 4 h ou la nuit à +4°C. Le précipité obtenu après centrifugation est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70 % et resuspendu 20 dans 60 ml d'eau distillée. Les produits de cette réaction ont ensuite été purifiés, clonés et séquencés selon les protocole décrit ci-après.

- Clonage et séquençage des fragments d'ADN recueillis :

25 Des ADN bouts francs avec des adénines non-appariées aux extrémités ont été générés : une réaction de "remplissage" a d'abord été effectuée : 25 μ l de la solution d'ADN précédemment purifiée ont été mélangés avec : 2 μ l d'une solution 2,5 mM contenant, en quantité 30 équimolaire, dATP + dGTP + dTTP + dCTP / 1 μ l d'ADN polymerase T4 (Boehringer-Mannheim ref. 1004 786) / 5 μ l de 10X "incubation buffer for restriction enzyme" (Boehringer-Mannheim ref. 1417 975) / 1 μ l d'une solution à 1 % de sérum-albumine bovine / 16 μ l d'eau distillée 35 stérile. Ce mélange a été incubé 20 minutes à 11°C. 50 μ l de tampon TE (Tris-EDTA) et 1 μ l de glycogène (Boehringer-

Mannheim ref. 901 393) y ont été ajoutés avant extraction des acides nucléiques avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylque (Sigma ref. P 3803), et précipitation à l'acétate de sodium comme décrit précédemment. L'ADN 5 précipité après centrifugation est resuspendu dans 10 µl de tampon 10 mM Tris pH 7.5. Puis, 5 µl de cette suspension a été mélangée avec 20 µl de tampon Taq 5 fois concentré, 20 µl de 5 mM dATP, 1 µl (5U) de Taq ADN polymerase (AmpliTaqTM) et 54 µl d'eau distillée stérile. 10 Ce mélange est incubé 2 h à 75°C avec un film d'huile à la surface de la solution. L'ADN en suspension dans la solution aqueuse prélevée en dessous du film d'huile après incubation est précipité comme décrit précédemment et resuspendu dans 2 µl d'eau distillée stérile. L'ADN obtenu 15 a été inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA CloningTM. Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2µl de "pCRTTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce 20 mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions données dans le kit TA Cloning[®] (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être 25 cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie 30 recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionné pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de 35 clonage du TA cloning kit. La réaction préalable au

séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage 5 automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer, modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

- Analyse des séquences clonées :

L'analyse discriminante sur les banques de données 10 informatiques des séquences clonées à partir des fragments d'ADN présents dans le mélange réactionnel a permis de mettre en évidence trois catégories de séquences : la première correspondait à des séquences totalement inconnues dans les banques de données et sans aucune 15 parenté avec des gènes décrits. La seconde, correspondait à des séquences totalement homologues à des portions de gènes cellulaires connus. La troisième correspondait à des séquences présentant des homologies partielles plus ou moins importantes avec des séquences connues de rétrovirus 20 ou d'éléments génétiques rétrotransposables comme les rétroposons ou rétrotransposons.

L'origine des séquences de la première catégorie est difficile à définir alors que pour la seconde, elle 25 s'explique par la présence attendue de fragments d'ADN cellulaire contaminant la fraction d'acides nucléiques extrait de l'échantillon viral concentré mais non purifié, après incubation dans les conditions requises pour la réaction de transcription inverse sus-mentionnée.

L'origine des séquences de la troisième catégorie 30 est manifestement rétroviral ou de type rétroviral. Il est connu que des séquences rétrovirales endogènes apparentées à un rétrovirus réplicatif, ou co-exprimées dans une même cellule infectée, peuvent être encapsidées dans les virions générés par une souche rétrovirale donnée (Linial 35 M.L. and Miller A.D. dans "Current topics in microbiology and immunobiology. Retroviruses, strategies of

replication" vol. 157, p. 125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K. éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990) et la présence de certaines séquences de type rétroviral peut s'expliquer par ce phénomène.

5 Cependant, parmi les séquences de cette catégorie, une séquence a été retrouvée le plus fréquemment et s'est avérée représenter la majorité des clones obtenus dans ces conditions à partir de l'isolat viral "POL-2" issu de la culture de la lignée PLI-2 entre le quarantième et le 10 soixantième passage en culture après établissement de la lignée continue selon le principe décrit dans le brevet n°WO 93/20188 précédemment cité. Le clone correspondant PSJ17 a été entièrement séquencé et la séquence obtenue, présentée dans la figure 1 (séquence ID N°1) a été analysée 15 à l'aide du logiciel "Geneworks®" sur les banques de données actualisées "Genebank®". L'analyse des banques de données n'a pas permis de trouver de séquence identique déjà décrite. Seule une homologie partielle a pu être retrouvée avec certains éléments rétroviraux connus. 20 L'homologie relative la plus intéressante concerne un rétrovirus endogène dénommé ERV-9, ou HSERV-9, selon les références (La Mantia et coll. Nucleic Acids Research 1991 ; 19, 1513-1520). Ainsi la séquence du clone PSJ17 a pu être localisée dans la région pol codant pour la 25 transcriptase inverse d'un rétrovirus, ou encore d'un virus possédant une enzyme avec une activité transcriptase inverse, par alignement avec la séquence décrite pour HSERV-9, tel que cela est présenté dans la figure 2. La traduction en acides aminés du clone PSJ17 est présentée 30 dans la figure 3, et la comparaison avec cette séquence protéique et la séquence protéique théorique de ERV9 telle que décrite par La Mantia et col est présentée dans la figure 4.

35 EXEMPLE 2 : OBTENTION DE CLONES APPARENTES A PSJ17, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1A, PAR AMPLIFICATION

ENZYMATIQUE (RT-PCR) SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA LIGNEE PLI-2.

Des amores nucléiques, PSJ17A et PSJ17B, ont été définies dans la séquence du clone PSJ17 et ont été 5 utilisées pour rechercher la présence de l'ARN et/ou de l'ADN correspondant à un virus contenant cette séquence, dans différents échantillons biologiques. Celles-ci sont définies ci-après :

| | Séquence | amorce | sens | PSJ17 | A : |
|----|---------------------|--------------------|----------|-------|-----|
| 10 | AAATTTCCCTCACTACCTG | (Séquence ID N° 2) | | | |
| | Séquence | amorce | antisens | PSJ17 | B : |
| | GGGTTTAAGAGTTGCACA | (Séquence ID N° 3) | | | |

Les réactions de PCR ont été faites dans un volume total de 100 μ l, contenant 200 ng d'ADN, 33 μ moles de 15 chaque amorce, 0,25 mM de chaque dNTP, 10 μ l de tampon 10X, et 2,5 U d'enzyme Taq. Les cycles d'amplification sont réalisés comme suit : dénaturation 95°C/5 minutes, hybridation des amores 50°C à 55°C/2 minutes, extension 72°C/2,5 minutes, puis pendant 33 cycles, 95°C/2minutes, 20 50°C à 55°C/2 minutes, 72°C/2,5 minutes, et enfin 95°C/2minutes, 50°C à 55°C/2 minutes et 72°C/7 minutes.

Les réactions de RT-PCR, selon un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans la demande de brevet n° EP 0 569 272 A1, ont été faites dans un volume 25 total de 100 μ l, contenant 200 ng d'ARN, 1 μ l de RNA Guard, 33 μ moles de chaque sonde, 0,25 mM de chaque dNTP, 10 μ l de tampon 10X, 2,5 U d'enzyme Taq. et 0,4 μ l d'enzyme RT (10 U) sont aussi ajoutés aux échantillons. Les cycles d'amplification sont réalisés comme suit : 30 dénaturation de l'ARN 65°C/10 minutes, synthèse de l'ADNC 50°C/8 minutes puis les cycles sont identiques à ceux de la PCR décrite ci-dessus. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler l'absence de contaminants (réaction sur de l'eau). Les produits ont été 35 analysés sur gel d'acrylamide 10 %.

Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, les produits issus de la PCR et de la RT-PCR ont été purifiés selon le procédé décrit dans l'exemple 1 5 puis directement clonés à l'aide du kit TA Cloning® (British Biotechnology), puis séquencés selon le protocole décrit dans l'exemple 1.

Le matériel biologique utilisé consiste en virion purifié à partir de l'isolat "POL-2" (ECACC n° V92072202) 10 selon la procédure décrite ci-après : les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 tpm pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les 15 surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30 % à 100 000g (ou 30 000 tpm dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la 20 fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucre dans un tampon PBS stérile (15 à 50 % poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 tpm (100 000 g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies 25 et 20 µl sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont ensuite diluées dans 30 du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 tpm (1000 000 g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'utilisation ultérieure qui en sera faite (Ex. Tampon 35 Guanidium Thiocyanate pour l'extraction des ARN ; PBS stérile pour le stockage à -80°C).

Notamment, un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans la demande de brevet n° EP 0 569 272 A1, utilisé sur de l'ARN purifié, utilisant des amores telles que décrites ci-dessus, a permis d'amplifier du matériel 5 nucléique sur une fraction de virion purifié sur gradient de saccharose selon la méthode décrite ci-dessus à partir de l'isolat "POL-2" (ECACC n° V92072202). Ce matériel nucléique une fois cloné et séquencé selon les techniques décrites dans l'exemple 1, s'est révélé être, dans ces 10 virions purifiés, le même matériel génétique que celui du clone PSJ17 obtenu à partir de l'échantillon de virions concentrés mais non-purifiés contenus dans un isolat "POL-2". Une réaction PCR avec les mêmes amores sur le même matériel, mais sans étape de synthèse d'un ADNc à 15 partir de l'ARN présent dans le matériel nucléique de l'échantillon analysé, n'a permis aucune amplification de matériel nucléique. Ces résultats indiquent clairement que la séquence du clone PSJ17 est présente sous forme d'ARN et pas d'ADN, dans les fractions contenant le pic 20 d'activité transcriptase inverse de type LM7, après purification sur gradient de saccharose. Ces résultats sont compatibles avec la présence de particules virales contenant un ARN génomique incluant la séquence du clone PSJ17 et une enzyme transcriptase inverse, liées à la 25 présence d'un rétrovirus non caractérisé par ses séquences spécifiques jusqu'alors, dans les fractions purifiées de virions produits par la lignée PLI-2.

Par ailleurs, la réaction RT-PCR sus-mentionnée (demande de brevet EP 0 569 272 A1) a été appliquée sur 30 des échantillons biologiques, issus de patients témoins exempts de SEP, obtenus dans des conditions identiques aux fractions de gradient de saccharose sus-mentionnées, à la différence près qu'aucune activité transcriptase inverse spécifique de type "LM7" n'y a été détectée. Les fractions 35 de même densité en saccharose que les pics d'activité transcriptase inverse répertoriés (environ 1.17 g/ml) ont

ainsi été utilisées. Dans ces échantillons provenant respectivement d'une culture de cellules leptoméningées de patiente atteinte de maladie de Strumpell-Lorrain, d'une culture de plexus choroïdes d'une patiente décédée 5 d'accident vasculaire cérébral, d'une lignée de lymphocytes B (lignée lymphoblastoïde spontanée) d'un patient atteint de maladie génétique non précisée, tous étant exempts de SEP, cette réaction RT-PCR avec les amorces contenues dans la région "PSJ17" n'a pas permis 10 d'amplifier de matériel nucléique ou, quand une amplification a été visualisée dans un cas, le matériel amplifié s'est révélé n'avoir aucun rapport avec la séquence "PSJ17" (homologie partielle des amorces avec des gènes cellulaires). Ainsi, dans ces échantillons issus de 15 témoins non-SEP et provenant de fractions de saccharose homologues à celles qui contiennent des particules virales associées à une activité transcriptase inverse dans les échantillons "POL-2/PLI-2" et "MS7PG/LM7PC" provenant de SEP, cette séquence rétrovirale n'a pas été retrouvée 20 associée à de l'ARN. Ces résultats sont compatibles avec l'absence de production de particules rétrovirales contenant la séquence du clone PSJ17 dans ce type de culture de cellules provenant de patients exempts de SEP.

Par contre ces séquences ont pu être détectées par 25 cette même technique PCR, telle que décrite ci-avant, dans des échantillons biologiques tels que des cellules humaines diverses, des sérums obtenus après formation du caillot sanguin, des liquides céphalo-rachidiens obtenus par ponction lombaire et pouvant contenir des débris 30 cellulaires, où de l'ADN humain était présent. Cela, chez des patients atteints de SEP, mais aussi chez des patients témoins et des témoins sains. Une étude en southern-blot avec le clone PSJ17 utilisé comme sonde, a confirmé que la 35 séquence du clone PSJ17 était apparentée à une famille de rétrovirus endogènes présents dans le génome humain. Etant donnée la relative homologie avec le rétrovirus endogène

ERV-9, il se peut que le rétrovirus contenant la séquence PSJ17 soit un membre d'une famille de rétrovirus endogènes apparenté à ERV-9, ou d'une nouvelle famille de rétrovirus endogènes proches d'ERV-9, ou encore, une souche exogène à 5 laquelle la famille endogène ERV-9 serait apparentée, dans la mesure où aucune homologie avec un rétrovirus exogène connu n'a été identifiée pour ERV-9, contrairement à toutes les séquences rétrovirales endogènes humaines caractérisées à ce jour, tel que cela apparaît dans le 10 tableau annexé.

Ces résultats sont donc compatibles avec une expression d'ARN issu d'une famille de rétrovirus endogènes que la demanderesse a dénommé MSRV-1A, ayant une homologie relative avec ERV-9, mais contenant un consensus 15 de séquences nucléiques avec le clone de référence PSJ17. Ce virus MSRV-1A peut être exprimé de manière différente entre les patients atteints de SEP et les personnes exemptes de SEP, par tout type de cellules susceptible d'exprimer ce rétrovirus. Ces résultats sont aussi 20 compatibles avec la présence d'un rétrovirus exogène MSRV-1A, ayant une homologie relative avec ERV-9, mais contenant un consensus de séquences nucléiques avec le clone de référence PSJ17, hébergé et exprimé par certaines cellules infectées chez les patients atteints de SEP et 25 pas chez les témoins sains ou exempts de SEP.

La séquence obtenue dans le clone PSJ17 et sus-décrise, sera le mieux utilisée pour la détection stricte d'ARN spécifiquement exprimé chez les patients atteints de SEP et, conséquemment, de peptides ou protéines contenant 30 la séquence d'acides aminés codée par cette séquence ARN ou un consensus apparenté à cette dernière et provenant d'un variant MSRV-1A. De même l'utilisation de ces séquences peptidiques est conséquemment envisageable pour obtenir des antigènes qui permettront de détecter la 35 réponse immunitaire à ces motifs antigéniques exprimés in vivo chez les patients atteints de SEP, dans la mesure où

ARN correspondant sont exprimés in vivo et permettent la synthèse protéique correspondante, de manière originale dans la SEP ou tout autre pathologie individualisée et trouvée associée à ce même phénomène d'expression 5 rétrovirale.

TABLEAU

Principaux rétrovirus endogènes humains

| Nom | Longueur (kb) | Nombre de copies | Relation avec les rétrovirus exogènes | Références |
|---------|---------------|------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| 4-1 | 8.8 | 5-100 | MoMuLV | Martin, PNAS, 1981 |
| 51-1 | 6 | 35-50 | MoMuLV | Siebel, Science, 1984 |
| ERV-1 | 3-4 | 1 | MoMuLV/BaEV | Bonner, PNAS, 1982 |
| ERV-3 | 9.9 | 1 | BaEV | O'Connell, Virology, 1984 |
| HLM-2 | 9 | 50 | MMTV | Callahan, PNAS, 1982 |
| HERV-K | 9.5 | 50 | MMTV | Ono, J. Virol., 1987 |
| HuRRS-P | 8-9 | 20-40 | MoMuLV | Kroger, J. Virol., 1987 |
| RTLV-H | 5.8 | 1000 | HTLV-1/BLV | Mager, J. Virol., 1987 |
| HERS-1 | 5-6 | 1 | HTLV-1 | Perl, Genomics, 1991 |
| M7-rel | 4-10 | 300 | M1 baboon RV | Noda, Nucl. Acids Res., 1982 |
| S71 | 6 | 1 | SSAV | Werner, Virology, 1990 |
| ERV-9 | 8 | 35-40 | ? | La Mania, Nucl. Acids Res., 1991 |
| Hs5 | 5-10 | ? | FelV/Fv-4 | Levy, J. Gen. Virol., 1990 |
| EHS-1 | 3.2-9.5 | ? | HIV-1 | Horwitz, J. Virol., 1992 |
| EHS-2 | 3.2-9.5 | ? | HIV-1 | |

REVENDICATIONS

1/ Virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes et associé à la sclérose en plaques, 5 issu d'une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches virales dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro 10 d'accès V93010816, et les souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées.

15 2/ Virus humain possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, associé à la sclérose en plaques, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées cellulaires dénommées respectivement PLI-2 déposée 20 le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et toutes les cultures cellulaires infectées susceptibles de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au 25 moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées.

3/ Virus caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et 30 préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

4/ Rétrovirus humain, associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que le gène pol de son génome 35 comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % d'homologie avec une séquence nucléotidique

appartenant au gène pol du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9.

5 5/ Rétrovirus humain associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que le gène pol de son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par le gène pol du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9.

10 6/ Rétrovirus humain, associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que le gène pol de son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

15 7/ Lignée cellulaire déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817.

8/ Souche virale déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816

20 9/ Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

25 10/ Fragment selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

30 11/ ARN ou ADN et notamment vecteur de réplication, comprenant un fragment selon la revendication 9 ou 10.

35 12/ Amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au

moins une partie d'un fragment selon la revendication 9 ou 10.

13/ Amorce selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle a au moins 10 nucléotides, et de préférence 5 choisie parmi SEQ ID N02 et SEQ ID N03.

14/ Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au 10 moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 9 ou 10.

15/ Sonde selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle a au moins 10 nucléotides.

16/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 15 14 ou 15 ou d'une amorce selon la revendication 12 ou 13, pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un virus associé à la sclérose en plaques.

17/ Composition thérapeutique antisens, notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, caractérisée 20 en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 14 ou 15.

18/ Procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un 25 ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leurs complémentaires, à au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 14 ou 15.

19/ Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN 30 et/ou ARN complémentaires, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce selon la revendication 12 ou 13 et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

20/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose 35 en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus et/ou leur ADN et/ou ARN

complémentaires à au moins une sonde selon la revendication 14 ou 15.

21/ Peptide codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, 5 caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique selon la revendication 9 ou 10.

22/ Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide selon la revendication 21.

10 23/ Oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus d'un peptide selon la revendication 21.

15 24/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide selon la revendication 21, ou au moins une protéine selon la revendication 22 ou au moins un oligopeptide selon la revendication 23.

20 25/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ligand spécifique à au moins un peptide selon la revendication 21, ou à au moins une protéine selon la revendication 22, ou à au moins un oligopeptide selon la revendication 23.

FIG 1

| | |
|---|-----|
| CAAGCCACCC AAGAACTCTT AAATTTCCTTC ACTACCCGTG GCTACAAGGT | 50 |
| TTCCTAAACCA AAGGCTCAGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTTAGGGT | 100 |
| TAAAATTATTC CAAAGGCACC AGGGCCCTCA GTGAGGAACG TATCCAGCT | 150 |
| ATACTGGGTT ATCCCTCATCC CAAAACCTA AAGCAACTAA GAGGGTTCT | 200 |
| TAGCATGATC AGGTTTCTGC CGAAAACAAG ATTCGGAGT ACAACCAAAA | 250 |
| TAGCCAGACC ATTATATACA CTAATTAAAGG AAACCTAGAA AGCCAATACC | 300 |
| TATTTAGTAA GATGGACACC TAAACAGAAG GCTTTCCAGG CCTTAAAGAA | 350 |
| GGCCCTAACCC CAAGCCCCAG TGTTCAGCTT GCCAACAGGG CAAGATTTT | 400 |
| CTTTATATGG CACAGAAAAA ACAGGAATCG CTCTAGGAGT CCTTACACAG | 450 |
| GTCCCCAGGGT TGAGCTTGCA ACCCGTGGCA TACCTGAATA AGGAAATTGA | 500 |
| TGTAGTGGCA AAGGGTTGGC CTCTATGTTT ATGGGTAAATG GNGGCAGTAG | 550 |
| CAGTCCTAGT ATCTGAAGCA GTAAAATAA TACAGGGAAAG AGATCTTCT | 600 |
| GTTGGACAT CTCTATGATGT GAAOGGCATA CTCACTGCTA AAGGAGACTT | 650 |
| GTTGGTGTCA GACAACCATT TACTTAAANIA TCAGGCCCTA TTACTTGAAG | 700 |
| ACCCAGTGCT GNGACTGGC ACTTGTGCAA CTCTTAAACC C | 741 |

FIG 2

| | | |
|-----------|---|-----|
| Consensus | CARGCYACYC WAGWCICCTT RAAYTTYCIM RCTIAMYRWC GSTACAAAGGT | 50 |
| PSJ17 | ..A..C..C. A...A.... A..T..C..C A...CCITG. .C..... | 50 |
| ERV9 pol | ..G..T..T. T...T.... G..C..T..A G...ATCAA. .G..... | 50 |
| Consensus | KTCYAWRYCR AAGCCYCACC TYTCCYYACA CGAGATTAGA TACTYAGGGT | 100 |
| PSJ17 | T..C..AAC..AT.... C...TC..... .T..... | 100 |
| ERV9 pol | G..T..TGT..GC.... T...CT... .C..... | 86 |
| Consensus | TAAATATCTA GGCCTAACTCT TAKCCAAAGG SACCAGGSC CTCAGYRAGG | 150 |
| PSJ17 |T..... C.....G.....TG... | 136 |
| ERV9 pol |G.....G.....C.....CA... | 136 |
| Consensus | AAYGWATMCA GCGTATACTG GSTTATCCIC RYCCYAAAC MYTAAARCAR | 200 |
| PSJ17 | ..C..T..C..G..... AT..C..A.. CC...G..A | 186 |
| ERV9 pol | ..T..A..A..C..... GC..T..G.. AT...A..G | 186 |
| Consensus | YTRAGRGRGT TCTTIRGAT KAYCAGGYTT YTCGGAMWA YARGATYCCY | 250 |
| PSJ17 | C.A..A.G..A.C.. G.T...T.. C.....AA. C.A...T..C | 236 |
| ERV9 pol | T.G..G.A..G.A.. T.C..C.. T.....CT. T-G...C..T | 234 |
| Consensus | RGRTAACAASC RARAYAGCCA GRCOMMTATA TACACTAATY AAGGAAACYC | 300 |
| PSJ17 | A.G....C. A.A.T..... A..AT..... T..... T. | 286 |
| ERV9 pol | G.A....G. G.G.C..... G..CC..... C..... C. | 276 |
| Consensus | AGARRGOMAA TACYYAT:TA GTTTRAGKGG AMMOMKARRC AGAAACRRCY | 350 |
| PSJ17 | ...AA..C.. ...CT..T.. ..A..AT.. .CA..CT..AA.. ...-GG..T | 333 |
| ERV9 pol | ...GG..A.. ...TC..C.. ...G..TG.. .AC..AG..GG.. ...AA..C | 326 |
| Consensus | TTGCMARRCY TAAAGMAGCC YCTARYMCAA GGYCCAGYKT TMACCYIKC | 400 |
| PSJ17 | ...C..GG..C ..A.. C..ACC... ..C....TG.. C...T.G.. | 383 |
| ERV9 pol | ...A..AA..T ..C.. T...GTA... ..T....CT.. A...C..T.. | 376 |
| Consensus | MACAGGRCAR RATTTCYCTT TATATGKCS AGARARACM RGRATMCTC | 450 |
| PSJ17 | A.....G..A....T.....G..C ..A.A.A.A G.A..C..... | 433 |
| ERV9 pol | C.....A..G A....C..... T..G ...G.G.G.C A.G..A.... | 426 |
| Consensus | TWGGAGTOCT YACNCARRYV CRWCGGAYRA SCYRCAACC MGTGGCAADAC | 500 |
| PSJ17 | .A..... T..A..GGTC ..GA....TG.. G..TG..... C..... | 483 |
| ERV9 pol | .T..... C..T..AACT ..AT....CA. C..CCA..... A..... | 476 |
| Consensus | CTRARTAAGG AAATTCGATGT AGTGGCAAAR GGYTGGCCTC AYNGTTIAGC | 550 |
| PSJ17 | ..G.A.....G.....G ..T..... T.....T. | 533 |
| ERV9 pol | ..A.G.....A.....A ..C..... CT.....A. | 526 |
| Consensus | GGTARAKGNR CCAGTGGCGC TCINAGYATC WGARGCWRY AAAATAATAC | 600 |
| PSJ17 |A.G..G ..A..A..... T... T..A..AG..T .. | 583 |
| ERV9 pol |G.T.CA ..G..C.. ...T..C.. A..G..T.A.C .. | 576 |
| Consensus | ARGGAARRGA TCTYNCIGTS TRGACWCTY ATGATGIRAA YGGCATACTM | 650 |
| PSJ17 | .G.....GA.. ...T....G ..G..AT..CG.. C.....C | 633 |
| ERV9 pol | .A.....AG.. ...CA..C..A..TA..TA.. T.....A | 625 |
| Consensus | RSTGCGYAAAG GARRYTTTG GYTRTCAGAC AACYRYYATC TTARNTIAYCA | 700 |
| PSJ17 | AC...T....GAC..G.. .T.G..... .CATT... ..A..T.. | 683 |
| ERV9 pol | GG...C.... .AGT..A.. .C.A..... .TGCC... ..GA..C.. | 675 |
| Consensus | GGCWCAYTM CTTGARGRRC CAGTGCTKNR AMIRYGCACW TGYRYRRCYC | 750 |
| PSJ17 | ...T...T.AA.G.G.G..C..GC....T..TGCA.A.T. | 733 |
| ERV9 pol | ...A...C..CG.GA..... TCA ..A..AT....A ..CATGG..C. | 725 |
| Consensus | TYAAMCCY 758 | |
| PSJ17 | .T..A..C 741 | |
| ERV9 pol | .C..C..T 733 | |

FIG 3

| | |
|--|-----|
| QATQELLNFL TTCGYKVSKP KAQLCSQEIR YLGLKLSKGT RGLSEERIQP | 50 |
| ILGYPHPKIL KQLRGFLSMI RFLPKTRFRG TIKIARPLYT LIKETQANT | 100 |
| YLVRWTPKQK AFQALKKALT QAPVFSLPTG QDFSLYGTEK TGIALGVLHQ | 150 |
| VRGMSLQPVA YLNKEIDVVA KGPHXLIWMM XAVAVXVSEA VKIIQGRDLX | 200 |
| VWTSHDVNGI LTAKGDLWLS DNHLLXYQAL LLEEPVLXLR TCATLKP | 247 |

FIG 4

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Consensus | QAT..LLNFL ...GYKVS.. KAQLC.Q... YLGL.L.KGT R.LS.E.IQP | 50 |
| Trad PSJ17 | ...QE.....TTC.....KP.....S.EIR....K.S... .G..E.R... . | 50 |
| Trad ERV9 modif | ...LD.....ANQ.....MS.....L.QVKI.A... .A..K.X... . | 50 |
| Consensus | IL.YP.PKTL KQLR.FL... .F.....PGARP... LIKETQ.ANT | 100 |
| Trad PSJ17 | ..G..H..... .G..SMI R.LPKTRF.. TIKI... LYTK... | 100 |
| Trad ERV9 modif | ..A..R..... .E..GIT S.-CRLWI.. YSET.....R... | 96 |
| Consensus | .LV.W.P... .F..LK.AL .QAP..SLPT QQ.FSLY..E ...IALGVLT | 150 |
| Trad PSJ17 | Y..R.T.K-Q KA.QA..K.. T...VF.... .D....GT. KTG..... | 149 |
| Trad ERV9 modif | H..E.E.EAE TT.KT..Q.. V...AL.... .N....VR. RAR..... | 146 |
| Consensus | Q..G...QPV AYL.KEIDWV AKGWFH.L.V ..AVAV..SE A.KIIQG.DL | 200 |
| Trad PSJ17 | .VR.MSL... .N.....X.W. MX....XV.. .V.....R.. | 199 |
| Trad ERV9 modif | .TH.TTP... .S.....C.R. VA....LA.. .I.....K.. | 196 |
| Consensus | ...T..DVNG IL.AKG.LWL SDN.LL.YQA LL.E.PVL.. .TC..L.P | 248 |
| Trad PSJ17 | XW.SH.... .T...D... .H..X...E..XL R..AT.K. | 247 |
| Trad ERV9 modif | TS..TY.... .G...S... .C..R...G..QI C..MA.N. | 243 |

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 495571
FR 9401529

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande enregistrée |
|---|--|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| D,A | WO-A-93 20188 (BIO MERIEUX) * le document en entier * --- | 1,2,7,8 |
| A | AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.8, no.5, Mai 1992 page 922 H. PERRON ET AL 'Retrovirus isolation from patients with multiple sclerosis: epiphénomène ou facteur causal ?' * abrégé * --- | 1-25 |
| D,A | LANCET THE, vol.337, no.8745, 6 Avril 1991, LONDON GB pages 862 - 863 H. PERRON ET AL 'Isolation of retrovirus from patients with Multiple Sclerosis' * le document en entier * --- | 1,2,7,8 |
| A | RESEARCH IN VIROLOGY, vol.143, no.5, 1992 pages 337 - 350 H. PERRON ET AL 'In vitro transmission and antigenicity of a Retrovirus isolated from a Multiple Sclerosis patient' * le document en entier * --- | 1,2,7,8 |
| D,A | JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol.74, 1993 pages 65 - 72 H. PERRON ET AL 'Herpes Simplex Virus ICPO and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with Multiple Sclerosis' * le document en entier * --- | 1,2,7,8 |
| | | -/-- |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL5) |
| | | C07K C12N |
| 1 | Date d'achèvement de la recherche 7 Octobre 1994 | Examinateur Le Cornec, N |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un autre une revendication en arrière-plan technologique général O : diversification non-tertiaire P : document intercalaire | | |
| T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet identifiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant | | |

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 495571
FR 9401529

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|---|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| A | <p>WO-A-93 07259 (SCLEROSE-FORENINGEN (THE DANISH MS-SOCIETY)) * le document en entier *</p> <p>-----</p> | 1-25 |
| DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.) | | |
| | | |
| 1 | Date d'achèvement de la recherche | Rechercheur |
| | 7 Octobre 1994 | Le Correc, N |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrêté-patent technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bâclissant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>G : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE